

HepG2 細胞の脂質代謝に及ぼす *cis*, *cis*-octadecadienoic acid および血清アルブミンの影響

四元 博晃・原 絵美・胡 宝・J. F. Nunez*・
車 載英・柳田 晃良
(食品栄養化学教室)
平成 8 年 9 月 6 日 受理

Effects of *cis*, *cis*-Octadecadienoic Acid and Serum Albumin on Lipid Metabolism in HepG2 Cells.

Hiroaki YOTSUMOTO, Emi HARA, Ying HU, J. F. Nunez*,
Jae Young CHA and Teruyoshi YANAGITA
(Laboratory of Nutrition Biochemistry)
Received September 6, 1996

SUMMARY

The present study was undertaken to examine the effects of *cis*, *cis*-octadecadienoic acid (linoleate, LA) and/or albumin (BSA) on the lipid metabolism in the human hepatoma cell line, HepG2. For experiment, HepG2 cells were plated in a 24-well plate (density of 2.0×10^5 cells/well), and the cells were cultured in either basal Dulbecco's modified Eagle's (DME) medium (basal medium), DME medium containing 0.2mM LA (LA medium), or DME medium containing both 0.2mM LA and BSA (BSA+LA medium). BSA was added at the concentration of 0.1, 0.4 or 0.8%. [^{14}C]Acetate (1.23KBq/mL medium) was added as a radioactive lipid precursor and the cells were incubated for 6 hours.

Addition of LA to the basal medium resulted in a decrease in the incorporation of [^{14}C]-acetate into the total cholesterol fraction. In contrast, an addition of BSA to LA-containing medium tended to increase the incorporation of [^{14}C]acetate into total cholesterol in a dose-dependent fashion. The alteration of cholesterol metabolism in HepG2 cells incubated in BSA+LA medium was attributed to an increase in the incorporation of [^{14}C]acetate into free cholesterol, but not the cholesteryl ester fraction. In addition, secretion of cholesterol was increased by BSA+LA medium, suggesting that BSA stimulates cholesterol secretion. No significant change in the incorporation of [^{14}C]acetate into total cellular lipids was observed among the groups. However, by incubation with BSA+LA medium, increased incorporation of [^{14}C]labelled fatty acid into cellular triglyceride and decreased incorporation into phospholipid were observed in cells incubated with BSA+LA medium as compared to those incubated with LA medium. Secretions of [^{14}C]labelled triglyceride, phospholipid and free fatty acid into the medium were also stimulated in HepG2 cells incubated with BSA+LA medium.

In conclusion, the present study suggests that in human hepatocytes both BSA and LA

* ベルギー国 Ancash 国立大学

influence lipid metabolism, and BSA enhances cholesterol synthesis and secretion.

Key words: Linoleate, Albumin, HepG2 cells, cholesterol and TG metabolism

結 言

肝臓における脂質代謝は脂肪酸、コレステロール、糖、アミノ酸や種々のホルモンの影響を受けることが知られている。これまでに、我々はn-6系およびn-3系脂肪酸やトランス型脂肪酸がヒト肝臓モデル細胞であるHepG2細胞の脂質代謝に及ぼす影響を検討し、脂肪酸の量と質の両者が著しい影響を与えることを認めている^{1,2)}。本実験で用いた9cis, 12cis-octadecadienoic acid (リノール酸) は必須脂肪酸の一種であり、生体膜構成成分としてあるいは生体膜機能の維持にとって極めて重要な役割をもつ。また、リノール酸はコレステロール低下作用を示し³⁻⁹⁾、リポタンパク質分泌に影響することが知られている。また、リノール酸はアラキドン酸カスケードの前駆物質としても重要である。一方、血清アルブミンは血中遊離脂肪酸や薬物と複合体を形成し運搬する役割をもつ。これまでに、培養細胞の培地に牛血清アルブミンを添加することにより、アポリポタンパク B100 の分泌が亢進することや^{10, 11)}、脂質合成が修飾を受けリポタンパク分泌に影響する可能性が示唆されている¹⁰⁾。しかし、リノール酸を十分量含む条件下においてアルブミン濃度の変動が肝臓細胞の脂質の合成と分泌に及ぼす影響については十分明らかにされていない。本研究では、ヒト肝臓由来のHepG2細胞培養系において、リノール酸とアルブミンがコレステロールとトリグリセリド代謝に及ぼす影響について検討した。

実 験 方 法

1. 実験材料と試薬

HepG2細胞はWistar研究所(Philadelphia, U.S.A.)から供与された。9-cis, 12-cis-octadecadienoic acid (リノール酸, LA) および牛血清アルブミン (BSA, 脂肪酸フリー) はSigma Chemical社(St. Louis, U.S.A.)から購入した。[1-¹⁴C] 酢酸はアマシャムジャパン(東京)から購入した。シンチレーションカクテル (Scintisol Ex-H) は同仁化学(熊本)から購入した。胎児牛血清 (FCS) およびDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) はGibco (Grand Island, New York)から購入した。ペニシリンおよびストレプトマイシンは明治製菓(東京)の製品を使用した。トリプシンはDifco Laboratories (Detroit Michigan, U.S.A.)から購入した。培養ディッシュおよび他の培養器具はFalcon (New Jersey, U.S.A.)の製品を用いた。

2. HepG2細胞の培養方法

HepG2細胞は10%FCS, ペニシリン(10万単位/L)およびストレプトマイシン(100mg/L)を含むDMEM(基本培地)を用い、37°C, 95%空気, 5%二酸化炭素の条件下で10cm Falcon dishで、実験に供せる細胞数になるまでほぼ1週間培養し、培地は2~3日ごとに交換した¹²⁻¹⁵⁾。

実験を開始する前に、細胞を24穴プレートにまき (2.0×10^5 個/well), 1 well あたり1mlの培

地を用いて培養した。細胞がコンフルエントな状態になったのを確認後、細胞を DMEM で 2 回洗浄し、試験培地を加えて実験を開始した。試験培地への交換と同時に、放射性脂質前駆体として $[^{14}\text{C}]$ 酢酸を 1.23KBq ($0.3\mu\text{Ci}$) 添加し、6 時間培養した。

3. 試験培地の調製法

実験に用いた試験培地は以下の方法で調製した。LA 溶液を終濃度が 0.2mM となるように取り、窒素ガスで乾固させた後、 0.1 、 0.4 および 0.8% BSA を含む基本培地を加えた。超音波発生機 (Sonifier 250, Branson 社製) を用いてマイクロチップリミットで 15 分間反応させ BSA-LA 複合体 (BSA+LA 培地) を形成させた。 $0.45\mu\text{m}$ フィルター (MILLEX-HV, MILLIPORE 社) を用いてろ過滅菌し、脂肪酸と BSA の両方を含む試験培地を調製した。また、LA のみを含む培地 (LA 培地) と、LA および BSA の両方を含まない培地 (DME 培地) を調製した。

4. HepG2 細胞の回収方法

HepG2 細胞は各培地中で 6 時間培養後、試験培地を回収し、細胞は冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、 0.8ml の PBS を加えてポリスマンを用いて回収した。回収した細胞と培地は分析に供するまで凍結 (-40°C) し保存した。

5. 細胞内脂質および培地脂質の抽出、分画および放射能活性の測定

細胞および培地の総脂質は Bligh & Dyer 法に従い抽出純化した¹⁶⁾。脂質の分画はシリカゲル G-薄層クロマトグラフィー (TLC) により行った¹⁷⁾。放射能活性の測定のためのシンチレーション溶液はシンチゾール Ex-H を用いた。放射能活性の測定は液体シンチレーションカウンター (WALLAC 1410, Pharmacia 社) を用いて行った。バックグラウンド値およびシリカゲルによるクエンチングは補正した¹⁸⁾。

6. 統計分析

実験によって得られたデータは Duncan's multiple range test を用いて統計処理した¹⁹⁾。

Table 1. Effects of BSA and 0.2 mM linoleate on the incorporations of $[^{14}\text{C}]$ acetate into total cholesterol, free cholesterol, and cholesteryl ester in HepG2 cells.

	Total cholesterol	Free cholesterol	Cholesteryl ester
	$[^{14}\text{C}] \text{ dpm} \times 10^{-2}/\text{dish}$		
Basal	36.8 ± 4.9^b	29.6 ± 4.1^b	7.2 ± 0.9^a
LA	23.4 ± 1.0^a	16.6 ± 0.5^a	6.8 ± 0.6^a
$0.1\% \text{ BSA} + \text{LA}$	25.1 ± 2.3^a	20.6 ± 2.1^{ac}	4.5 ± 0.2^b
$0.4\% \text{ BSA} + \text{LA}$	29.2 ± 1.0^{ab}	26.4 ± 0.8^{bc}	2.8 ± 0.2^c
$0.8\% \text{ BSA} + \text{LA}$	28.4 ± 2.2^{ab}	25.4 ± 2.1^{bc}	3.0 ± 0.2^c

HepG2 cells were incubated in DMEM with 0.1 , 0.4 or 0.8% BSA, 0.2 mM linoleate and 1.23KBq $[^{14}\text{C}]$ acetate for 6 hrs. Values are the means \pm SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

BSA; bovine serum albumin, LA; linoleate.

結 果

1. 細胞コレステロール (Chol) 生合成

表 1 に細胞総 Chol, 遊離型およびエステル型 Chol への $[^{14}\text{C}]$ 酢酸の取り込みを示す。培地に BSA と LA の両方を含まない DME 培地と比べて, 0.2mM LA を含む LA 培地で総 Chol への取り込みは顕著に低下し, LA の添加が Chol の de novo 合成を阻害することを示した。一方, LA と BSA の同時添加培地では, LA 培地と比べて総 Chol への取り込みは増加傾向を示したが, BSA 添加濃度の影響は認められなかった。

次に遊離型及びエステル型 Chol 画分への取り込みを比較した。その結果, $[^{14}\text{C}]$ 酢酸の遊離型 Chol への取り込み量は, DME 培地と比べて, LA 培地で有意に低下した (56%)。一方, LA 培地と比較して, BSA+LA 培地では遊離型 Chol への取り込みは BSA 濃度依存的に増加した。DME 培地と LA 培地間ではエステル型 Chol への $[^{14}\text{C}]$ 酢酸の取り込み量に差はなかったが, BSA+LA 培地ではエステル型 Chol への取り込みは顕著に低下し, エステル型 Chol 生成の抑制を示唆した。この低下は BSA 0.4% レベルまで濃度依存的であった。

2. 培地に分泌された $[^{14}\text{C}]$ Chol 量

表 2 に培地中の $[^{14}\text{C}]$ Chol 量を示す。DME 培地と比べて, LA 培地では $[^{14}\text{C}]$ 総 Chol の分

Table 2. Effects of BSA and 0.2 mM linoleate on the secretion of $[^{14}\text{C}]$ labeled total cholesterol, free cholesterol, and cholesteryl ester from HepG2 cells.

	Total cholesterol	Free cholesterol	Cholesteryl ester
	$[^{14}\text{C}] \text{ dpm} \times 10^{-1}/\text{dish}$		
Basal	15.2 \pm 0.7 ^{ab}	10.4 \pm 0.4 ^a	4.9 \pm 0.3 ^a
LA	11.3 \pm 0.4 ^a	6.2 \pm 0.2 ^a	5.1 \pm 0.3 ^a
0.1 %BSA+LA	17.6 \pm 1.3 ^b	15.1 \pm 1.1 ^b	2.5 \pm 0.3 ^b
0.4 %BSA+LA	22.8 \pm 2.5 ^c	20.3 \pm 2.4 ^c	2.5 \pm 0.1 ^b
0.8 %BSA+LA	25.5 \pm 1.9 ^c	22.2 \pm 1.3 ^c	3.3 \pm 0.6 ^b

HepG2 cells were incubated in DMEM with 0.1, 0.4 or 0.8 %BSA, 0.2 mM linoleate and 1.23KBg $[^{14}\text{C}]$ acetate for 6hrs. Values are the means \pm SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

BSA; bovine serum albumin, LA; linoleate.

Table 3. Incorporation of $[^{14}\text{C}]$ acetate into intracellular total lipids, triglyceride and phospholipid.

	Total lipids	Triglyceride	Phospholipid
	$[^{14}\text{C}] \text{ dpm} \times 10^{-3}/\text{dish}$		
Basal	75.3 \pm 11.9	28.9 \pm 1.3 ^b	48.5 \pm 7.0 ^a
LA	66.7 \pm 6.1	20.1 \pm 1.6 ^a	43.2 \pm 2.5 ^a
0.1 %BSA+LA	66.0 \pm 10.4	27.1 \pm 1.2 ^b	31.5 \pm 2.0 ^b
0.4 %BSA+LA	59.0 \pm 6.9	33.3 \pm 2.2 ^c	26.9 \pm 1.8 ^b
0.8 %BSA+LA	71.9 \pm 9.8	33.1 \pm 1.7 ^c	24.4 \pm 2.0 ^b

HepG2 cells were incubated in DMEM with 0.1, 0.4 or 0.8 %BSA, 0.2 mM linoleate and 1.23KBg $[^{14}\text{C}]$ acetate for 6hrs. Values are the means \pm SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

BSA; bovine serum albumin, LA; linoleate.

Table 4. Effects of BSA and 0.2 mM linoleate on the secretion of [14 C]labeled triglyceride and phospholipid from HepG2 cells.

	Triglyceride	Phospholipid
	[14 C] dpm $\times 10^{-2}$ /dish	
Basal	12.8 \pm 0.4 ^a	0.73 \pm 0.13 ^a
LA	12.5 \pm 0.5 ^a	0.74 \pm 0.12 ^a
0.1 %BSA+LA	21.1 \pm 0.4 ^b	5.37 \pm 0.46 ^b
0.4 %BSA+LA	28.2 \pm 1.0 ^c	6.05 \pm 0.25 ^b
0.8 %BSA+LA	34.1 \pm 0.9 ^d	5.31 \pm 0.36 ^b

HepG2 cells were incubated in DMEM without FCS with 0.1, 0.4 or 0.8 %BSA, 0.2 mM linoleate and 1.23KBg [14 C]acetate for 6hrs. Values are the means \pm SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. BSA; bovine serum albumin, LA; linoleate.

Table 5. Effects of BSA and 0.2 mM linoleate on the secretion of [14 C]labeled free fatty acid from HepG2 cells.

	[14 C] dpm $\times 10^{-2}$ /dish
Basal	1.14 \pm 0.16 ^a
LA	1.05 \pm 0.13 ^a
0.1 %BSA+LA	21.2 \pm 0.6 ^b
0.4 %BSA+LA	43.5 \pm 5.5 ^c
0.8 %BSA+LA	80.7 \pm 4.5 ^d

HepG2 cells were incubated in DMEM without FCS with 0.1, 0.4 or 0.8 %BSA, 0.2 mM linoleate and 1.23KBg [14 C]acetate for 6hrs. Values are the means \pm SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. BSA; bovine serum albumin, LA; linoleate.

泌は低下傾向を示した。しかしながら、BSA+LA 培地では [14 C] 総 Chol の分泌量は BSA 濃度依存的に高値を示した。各画分への影響をみると、DME 培地と比較して、LA 培地では [14 C] 遊離型 Chol の分泌量は低下傾向を示し、LA 培地への 0.1%BSA 添加で著しい増加が認められた。 [14 C]遊離型 Chol の分泌の増加は BSA 濃度依存的であった。DME 培地と LA 培地では [14 C] エステル型 Chol の分泌量は同程度であった。BSA+LA 培地では [14 C] エステル型 Chol の分泌は低下した。

3. [14 C] 酢酸からの細胞総脂肪酸への取り込みと [14 C] 脂肪酸のトリグリセリド (TG) およびリン脂質 (PL) への取り込み

表 3 に [14 C] 酢酸からの総脂肪酸への取り込み量と生成した [14 C] 脂肪酸の TG および PL への取り込み量を示した。 [14 C]酢酸からの脂肪酸への取り込み量に LA および BSA 添加の著しい影響は認められなかった。しかし、LA 培地と比べて、BSA+LA 培地で [14 C] 脂肪酸の TG への取り込み量は増加し、PL への取り込み量は逆に低下した。これらの応答は BSA 濃度依存的に顕著となった。すなわち、TG と PL への [14 C] 脂肪酸の取り込みの間には高い負の相関 ($r = -0.980$) が認められた。

4. [14 C] TG および PL の培地への分泌

表 4 に培地中に分泌された [14 C]TG と PL 量を示す。 [14 C]TG の分泌量に DME 培地と LA 培地間で差はなかった。しかし LA 培地と比較した場合、BSA+LA 培地で [14 C]TG の分泌量は BSA 濃度依存的に著しく増加した。 [14 C]PL の分泌量も LA 添加の影響はなかったが、BSA+LA 培地では顕著に増加した。 [14 C]PL の分泌量には BSA 濃度による影響はなかった。

5. [14 C] 遊離脂肪酸の培地への分泌

表 5 に [14 C] 遊離脂肪酸の培地への分泌量を示す。 [14 C] 遊離脂肪酸の培地への分泌量は、LA 添加の影響はなかったが、BSA+LA 培地では BSA 濃度の増加と共に著しく増加した。

考 察

ヒトやラットで LA の摂取は血清 Chol 低下作用を示すことが知られているが³⁻⁹⁾, この応答が肝臓細胞脂質代謝への LA の直接の影響に基づくものかは明らかにされていない。また, BSA の脂質代謝への影響についての情報も十分ではない。本研究では, LA (0.2mM) や種々の濃度の BSA の培地への添加がヒト肝臓モデル細胞 HepG2 脂質代謝にどのような影響を及ぼすか検討した。HepG2 細胞培養の基本培地として DMEM (DME 培地) を用い, この DME 培地に LA を添加した LA 培地, LA と BSA の両方を添加した LA+BSA 培地の影響を比較した。

Chol 代謝への影響について検討した結果, DME 培地と比べて, LA 添加により [¹⁴C] 酢酸からのステロール de novo 合成は低下し, 培地への [¹⁴C] ステロールの分泌も減少した。これまで, LA は HepG2 細胞からの Chol 分泌を低下させる^{1,2)}あるいは影響しない²⁰⁾との相反した結果が報告されているが, 本実験結果は前者を支持し, LA が肝細胞 chol 代謝に関与していることを示した。生体内のコレステロールは遊離型とエステル型の両形態で存在する。そこで, 細胞ステロール合成の変動がいずれのコレステロール合成の変動によるのか検討した。その結果, LA 添加によるステロール合成の低下は遊離型 Chol への取り込みの低下に起因することが示された。

次に, LA と BSA を同時に添加した場合のステロール合成と分泌への影響を調べた。LA 培地と比べて, BSA+LA 培地では BSA 濃度の増加に伴い細胞中のステロール合成は増加傾向を示し, これは遊離型 Chol の合成増加に起因していた。しかし, DME 培地レベルまでは回復しなかった。一方, エステル型 Chol 合成量は BSA 濃度依存的に低下し, BSA がエステル型 Chol 合成を抑制することを示唆した。

BSA+LA 培地における Chol の分泌増加は主に遊離型 Chol 分泌の増加に起因しており, BSA による遊離 Chol 合成の増加を反映しているものと考えられた。BSA+LA 培地でエステル型 Chol の分泌量は低値を示したが (表 2), 合成量に対する分泌割合はむしろ増加していた (DME 培地, 6.34%, LA 培地, 6.94%, 0.1%BSA+LA 培地, 5.23%, 0.4%BSA+LA 培地, 8.20%, 0.8%BSA+LA 培地, 9.82%)。

以上のことから, HepG2 細胞では LA は遊離型 Chol 合成を抑制し, BSA はエステル型 Chol 合成を抑制する作用をもつことが示唆された。この結果は, Yanagita ら¹⁾, Cianflone ら¹⁰⁾の報告と一致する。LA と BSA がコレステロール代謝へ異なる影響を示す機序として, LA が Chol 合成の律速酵素, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼへ影響し, BSA がエステル型 Chol 合成酵素であるアシル CoA:コレステロールアシルトランスフェラーゼ活性に影響している可能性が考えられる。

外因性脂肪酸は一般に脂肪酸合成の律速酵素 acetylCoA Carboxylase を阻害することにより, 脂肪酸の生合成を抑制すると考えられているが, 本実験での LA 添加の効果は著しくなかった。しかし, 新しく合成された脂肪酸の TG 合成への利用は LA 添加により低下していた。この理由として, 添加された LA が直接 TG 合成に利用されていることが推察される。事実, HepG2 細胞系でも LA 添加は [³H] glycerol からの TG de novo 合成を亢進させることが示されており²⁾, ラット肝臓灌流実験系²¹⁾およびラットでの実験系²²⁾でも添加した LA は肝臓 TG に多く取り込まれることが報告されている。LA 培地と比較した場合, BSA+LA 培地では BSA 濃度依存的に [¹⁴C] 脂肪酸の TG への取り込み量は高く, PL への取り込み量は低下しており, 両者間で高い逆の相関関係が得られた (相関係数 $r = -0.980$)。すなわち, ヒト肝細胞では BSA が

TG 合成を増加させ PL 合成を抑制するという reciprocal な影響が示された。この作用機序は明らかではないが、アルブミンはリン脂質合成の律速酵素 CTP:phosphocholine cytidyltransferase 活性を阻害することから、リン脂質合成が抑制されるためグリセロ脂質の前駆体ジアシルグリセロールが増加し TG 合成に利用されている可能性が考えられる。今後、BSA の TG 合成最終酵素ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ活性への影響を含めて検討する必要がある。また、炭素数が18個で二重結合が1つのオレイン酸は HepG2 細胞での TG 合成を顕著に亢進し分泌も促進することが報告されている²³⁾²⁴⁾。本実験では、LA の基本培地への添加により [¹⁴C]TG および PL の分泌量に差は認められないことから、脂肪酸の二重結合の位置と数が肝細胞のグリセロ脂質代謝に異なる影響を与えることを示唆する。

本研究から、ヒト肝臓モデル細胞 HepG2 において LA はコレステロール合成を抑制し、BSA はコレステロール合成を増加させる作用を示すことが認められた。LA と BSA の同時添加はリポ蛋白質構成脂質の分泌を亢進させ、BSA は TG 合成を亢進させることが示された。

参 考 文 献

- 1) Yanagita, T., Shinkai, K., Yamamoto, K., Ikeda, I., Sugano, M. : Effect of trans-isomers of linoleic acid on lipid synthesis and secretion in HepG2 cells. Workshop : Trans-Fatty Acid ; Nutrition and Physiology at Xth international Congress of Nutrition, Adelaide, Australia, Abstract 37, October 1993
- 2) 四元博晃：リノール酸トランス異性体の HepG2 細胞脂質代謝に及ぼす影響 佐賀大学大学院農学研究科修士論文 (1996)
- 3) Harris, W. S., Connor, W. E., McMurphy, M. P. : The comparative reduction of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats : salmon oil versus vegetable oils. *Metabolism*, 32 : 179-184 (1983)
- 4) Paul, J. N. : Polyunsaturated fatty acids (n-3, n-6). *Am. J. Clin. Nutr.*, 45 : 1161-1167 (1987)
- 5) Leaf, A., P. C. Weber : Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N. Engl. J. Med.*, 318 : 549-557 (1988)
- 6) Spritz, N., Ahrens Jr., E. H., Grundy, S. : Sterol balance in man as plasma cholesterol concentrations are altered by exchanges of dietary fat. *J. Clin. Invest.*, 44 : 1482-1493 (1965)
- 7) Connor, W. E., Witiak, D. T., Stone, D. B., Armstrong, M. L. : Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition. *J. Clin. Invest.*, 48 : 1363-1375 (1969)
- 8) Shepherd, J., Pckard, C. J., Grundy, S. M., Yeshurum, D., Gotto, Jr., A. M., Taunton, O. D. : Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoprotein in man. *J. Lipid. Res.*, 21 : 91-99 (1980)
- 9) Balasubramaniam, S., Simons, L. A., Chang, S., Hickie, B.J. : Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich n-3 fatty acids in the rat. *J. Lipid. Res.*, 26 : 684-689 (1985)
- 10) Cianflone, K., Vu, H., Zhang, Z., Sniderman, D. A. : Effects of albumin on lipid synthesis, apo B-100 secretion, and LDL catabolism in HepG2 cells. *Atherosclerosis*, 107 : 125-135 (1994)
- 11) Pullinger, R. C., North, D. J., Teng, Ba-Bie, Rificii, A. V., Ronhild de Brito, A. E., Scott, J. : The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells : regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J. Lipid Res.*, 30 : 1065-1077 (1989)
- 12) Dashti, N. : The effect of low density lipoproteins, cholesterol and 25-hydroxycholesterol on apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.*, 267 : 7160-7169 (1992)
- 13) Turley, S. D., Herndon, M. W., Dietschy, J. M. : Reevaluation and application of the dual-isotope plasma ratio method for the measurement of intestinal cholesterol absorption in the hamster. *J. Lipid. Res.*, 35 : 328-339 (1994)

- 14) Yanagita, T., Yamamoto, K., Ishida, S., Sonda, K., Morito, F., Saku, K., Sakai, T. : Effects of simvastatin, a cholesterol synthesis inhibitor, on phosphatidylcholine synthesis in HepG2 cells. *Clin. Ther.*, 16 : 200-208 (1994)
- 15) Yanagita, T., Sonda, K., Yamamoto, K., Yotsumoto, H., Nunez, F. J., Murakami, S. : Effect of a new acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor, HL-004, on cholesterol esterification and lipid metabolism in HepG2 cells. *Curr. Ther. Res.*, 56 : 787-795 (1995)
- 16) Bligh, E. G., Dyer, W. J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 : 911-917 (1959)
- 17) Yanagita, T., Satoh, M., Nomura, H., Enomoto, N., Sugano, M. : Alteration of hepatic phospholipids in rats and mice by feeding di-(2-ethylhexyl) adipate and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Lipids*, 22 : 572-577 (1987)
- 18) Yanagita, T., Satoh, M., Enomoto, N., Sugano, M. : Di-(2-ethylhexyl)phthalate enhances hepatic phospholipid synthesis in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 919 : 64-70 (1987)
- 19) Steel, R. G. D., Torrie, J. H. : *Principales and Procedures of Statistics. A Biomedical Approach*, McGraw Hill Publishing Co., New York. (1980)
- 20) Erickson, K. S., Fielding E. P. : Parameters of cholesterol metabolism in human hepatoma cell line, Hep-G2. *J. Lipid Res.*, 27 : 875-883 (1986)
- 21) Ide, T., Sugano, M. : Oxidation and esterification of cis- and trans-isomers of octadecenoic and octadecadienoic acids in isolated rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 794 : 281-291 (1984)
- 22) Spady, K. D. : Regulatory effects of individual n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on LDL transport in the rat. *J. Lipid Res.*, 34 : 1337-1346 (1993)
- 23) Homan, R., Grossman, E. J., Pownall, J. H. : Differential effects of eicosapentaenoic acid and oleic acid on lipid synthesis and secretion by HepG2 cells. *J. Lipid Res.*, 32 : 231-241 (1991)
- 24) Furukawa, S., Hirano, T. : Rapid stimulation of apolipoprotein B secretion by oleate is not associated with cholesteryl ester biosynthesis in HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1170 : 32-37 (1993)